

PCT/JP00/02295

07.04.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 APR 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 6月16日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第169447号

出 願 人
Applicant (s):

味の素株式会社

09/926294

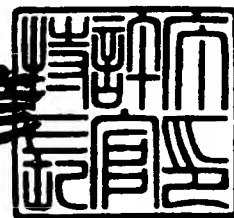
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3089892

| | |
|-----------|---|
| 【書類名】 | 特許願 |
| 【整理番号】 | P-6500 |
| 【提出日】 | 平成11年 6月16日 |
| 【あて先】 | 特許庁長官殿 |
| 【国際特許分類】 | C12P 13/06 |
| 【発明の名称】 | L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法 |
| 【請求項の数】 | 9 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵 技術研究所内 |
| 【氏名】 | 郡司 義哉 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵 技術研究所内 |
| 【氏名】 | 安枝 寿 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵 技術研究所内 |
| 【氏名】 | 杉本 慎一 |
| 【特許出願人】 | |
| 【識別番号】 | 000000066 |
| 【氏名又は名称】 | 味の素株式会社 |
| 【代理人】 | |
| 【識別番号】 | 100089244 |
| 【弁理士】 | |
| 【氏名又は名称】 | 遠山 勉 |
| 【選任した代理人】 | |
| 【識別番号】 | 100090516 |
| 【弁理士】 | |

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03 - 3669 - 6571

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第103143号

【出願日】 平成11年 4月 9日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9117157

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。

【請求項2】 L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項3】 L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項4】 L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項5】 ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項6】 L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された請求項5記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項7】 メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである請求項1～6のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項9】 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-アミ

ノ酸の製造法、及び同製造法に用いる微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

Ｌーリジン、Ｌーグルタミン酸、Ｌースレオニン、Ｌーロイシン、Ｌーイソロイシン、Ｌーバリン及びＬーフェニルアラニン等のアミノ酸は、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換えDNA技術によりＬーグルタミン酸の生合成酵素を増強することによって、Ｌーグルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0003】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、Ｌーアミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なＬーアミノ酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりアミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特公昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特開昭49-125590号公報）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、ミクロサイラス属（特開昭52-18886号公報）、メチロバチルス属（特開平4-91793号公報）、バチルス属（特開平3-505284号公報）などに属する微生物を用いる方法が知られている。

【0005】

しかし、これまでメチロフィラス属細菌を用いてＬーアミノ酸を製造することは知られていない。また、組換えDNAを用いたメチロフィラス属細菌の形質転換方法として、EP 0 035 831 A、EP 0 037 273 A、EP 0 066 994 Aが知られているが、メチロフィラス属細菌のアミノ酸の生産性の改善に組換えDNA技術が適

用された例は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なL-アミノ酸生産菌及び同生産菌を用いたL-アミノ酸の製造法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メチロフィラス属細菌がL-アミノ酸の製造に適していることを見出した。さらに、従来、メチロフィラス属細菌の栄養要求性変異株を得ることは困難であるとされてきた (FEMS Microbiology Rev. 39, 235-258 (1986)、Antonie van Leeuwenhoek 53, 47-53 (1987)) が、本発明者らは同細菌の栄養要求性変異株を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。
- (2) L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである (1) のメチロフィラス属細菌。
- (3) L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する (1) のメチロフィラス属細菌。
- (4) L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された (1) のメチロフィラス属細菌。
- (5) ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する (1) のメチロフィラス属細菌。
- (6) L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された (5) のメチロフィラス属細菌。

(7) メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである (1) ~ (6) のいずれかの細菌。

(8) 前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中に L-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物から L-アミノ酸を採取することを特徴とする L-アミノ酸の製造法。

(9) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする (8) の方法。

【0009】

尚、本明細書において「L-アミノ酸生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中に有意な量の L-アミノ酸を蓄積する能力、又は菌体中のアミノ酸含量を増加させる能力をいう。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌である。本発明のメチロフィラス属細菌としては、例えばメチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) AS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファス AS1株 (NCIMB10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

【0011】

本発明により生産される L-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン等が挙げられる。生産されるアミノ酸は 1 種類でもよく、2 種又は 3 種以上であってもよい。

【0012】

L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌は、メチロフィラス属細菌

の野生株にL-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、L-アミノ酸生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0013】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンハイドロキサメート、S-（2-アミノエチル）-システイン、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

【0014】

また、L-グルタミン酸生産菌はオレイン酸要求変異株等として、L-スレオニン生産菌は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸耐性変異株として、L-ホモセリン生産菌はL-スレオニン要求変異株又はL-フェニルアラニンアナログ耐性変異株として、L-フェニルアラニン生産菌は、L-チロシン要求変異株として、L-イソロイシン生産菌はL-ロイシン要求変異株として、L-プロリン生産菌は、L-イソロイシン要求変異株として、育種することができる。

さらに、後記実施例に示すように、分岐鎖アミノ酸（L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン）の1種又は2種以上を生産する菌株は、カザミノ酸要求

株として取得され得る。

【0015】

本発明者は、メチロフィラス属細菌から変異株を取得するために、まずストレプトマイシン耐性株の出現頻度を指標に最適な変異処理条件を詳細に検討した。その結果、変異処理後の生存率が約0.5%となる条件のとき、ストレプトマイシン耐性株の出現頻度が最高となり、この条件により栄養要求株を取得することに成功した。また、変異株のスクリーニングもこれまでE. coli等で行われているよりも大幅にスケールアップして行うことにより、困難とされてきた栄養要求株の取得に成功した。

上記のように、変異株取得に好適な条件でメチロフィラス属細菌を変異処理することにより変異株の取得が可能であることが判明したので、変異処理方法に応じて変異処理後の生存率が約0.5%となるような条件を適宜設定することにより、所望の変異株を取得することが容易となる。

【0016】

メチロフィラス属細菌から変異株を得るための変異処理としては、紫外線照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、メチロフィラス属細菌の自然突然変異株を選択することによっても、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を得ることできる。

L-アミノ酸アナログ耐性変異株は、例えば、変異処理したメチロフィラス属細菌を種々の濃度のL-アミノ酸アナログを含有する寒天培地に接種し、コロニーを形成する菌株を選択することにより、取得することができる。

また、栄養要求性変異株は、メチロフィラス属細菌のコロニーを目的の栄養物質を含む寒天培地に形成させ、これを前記栄養物質を含まない寒天培地にレプリカし、同栄養物質を含まない寒天培地で生育できない菌株を選択することにより、取得することができる。

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0017】

〔L-リジン〕

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロフィラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0018】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メチロフィラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)) K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIM B10515) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA, Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297 (1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052 (1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0019】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフ

ィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メチロフィラス属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0020】

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号1に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号2に例示する。また、E. coli由来の野生型lysCの塩基配列を配列番号3に、同塩基配列によってコードされる野生型AKIIIのアミノ酸配列を配列番号4に例示する。

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

【0021】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0022】

また、メチロフィラス属細菌で機能するベクターとは、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y. D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) 等が挙げられる。

【0023】

dapA及びlysCとメチロフィラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【0024】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/16042号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

【0025】

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号1に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、配列番号3に示す野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがT変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

【0026】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)) が挙げられる。

【0027】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及lysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

【0028】

DDPS活性及びAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及lysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される (特開平1-215280号公報参照)。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP_Rプロモーター、P_Lプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及lysCの発現が強化されることによってDDPS活性及びAK活性が増幅される。発現調節配列の増強は、dapA及lysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0029】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色

体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

【0030】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（W0 95/23864参照）。

【0031】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、以下に示す他のアミノ酸についても同様に適用することができる。

【0032】

〔L-グルタミン酸〕

メチロフィラス属細菌へのL-グルタミン酸生産能は、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭61-268185号）、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アコニット酸ヒドラターゼ（特開昭62-294086号）、クエン酸シンターゼ（特開昭62-201585号、

特開昭 63-119688号)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (特開昭 60-87788号、特開昭 62-55089号)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ (特開昭 63-102692号)、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ (WO 99/07853) 等の酵素をコードする DNA を導入することによって、付与することができる。

【0033】

さらに、本発明の微生物は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (α KGDH)、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。

【0034】

〔L-スレオニン〕

L-スレオニン生産能は、例えば、スレオニンオペロンを含有した組換えプラスミド (特開昭 55-131397号公報、特開昭 59-31691号公報、特開昭 56-15696号公報、および特表平 3-501682号公報参照) でメチロフィラス属細菌を形質転換することにより、付与又は増強することができる。

また、L-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を有するスレオニンオペロン (特公平 1-29559号公報)、ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (特開昭 60-012995号)、又はホモセリンキナーゼ及びホモセリンデヒドロゲナーゼをコード

する遺伝子（特開昭61-195695号）を増強することによっても、生産性を付与又は増強することができる。

【0035】

さらに、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異を有する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNAを導入することによって、L-スレオニン生産能を向上させることができる。

【0036】

〔L-バリン〕

L-バリンの生産能の付与は、例えば、制御機構が実質的に解除されたL-バリン生合成系遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入することによって行うことができる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-バリン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。

【0037】

L-バリン生合成系遺伝子としては、例えばE. coliの*ilvGMEDA*オペロンが挙げられる。尚、*ilvA*遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L-イソロイシン生合成系の律速段階であるL-スレオニンから2-ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する。したがって、L-バリン合成系の反応を効率よく進行させるためには、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないオペロンを用いることが好ましい。このようなスレオニンデアミナーゼ活性を発現しない*ilvGMEDA*オペロンとしては、スレオニンデアミナーゼ活性を失うような変異が*ilvA*に導入された、又は*ilvA*が破壊された*ilvGMEDA*オペロン、あるいは*ilvA*が欠失した*ilvGMED*オペロンが挙げられる。

【0038】

また、*ilvGMEDA*オペロンは、L-バリン及び／又はL-イソロイシン及び／又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい。

上記のような、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションが解除された*ilvGMEDA*オペロンは、野生型*ilvGMEDA*オペロンを

変異処理し、または遺伝子組換え技術を用いて改変することにより得られる（以上、WO96/06926参照）。

【0039】

〔L-ロイシン〕

L-ロイシンの生産能の付与または増強は、例えば、上記L-バリン生産に必要な性質に加えて、制御機構が実質的に解除されたL-ロイシン生合成系遺伝子をエシェリヒア属に属する微生物に導入することによって行われる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-ロイシン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。このような遺伝子として、例えば、L-ロイシンによる阻害が実質的に解除された *leuA* 遺伝子が挙げられる。

【0040】

〔L-イソロイシン〕

L-イソロイシンは、例えば、*E. coli*由来のL-スレオニンによる阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼIーホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする *thrA* 遺伝子を含む *thrABC* オペロンと、L-イソロイシンによる阻害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードする *ilvA* 遺伝子を含みかつアテニュエーションに必要な領域が除去された *ilvGMEDA* オペロンとを導入することにより、L-イソロイシン生産性を付与することができる（特開平8-47397参照）。

【0041】

〔その他のアミノ酸〕

L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-スレオニン及びL-イソロイシンは、メチロフィラス属細菌のホスホエノールピルビン酸の生産能を上昇させることによって、生合成が強化され得る（WO97/08333）。

【0042】

L-フェニルアラニン及びL-チロシンは、脱感作型コリスミン酸ムターゼープレフェン酸デヒドラターゼ（CM-PDT）遺伝子（特開平5-236947

号、特開昭62-130693号公報参照)、脱感作型DS(3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ)遺伝子(特開平5-236947号、特開昭61-124375号公報参照)を増強することによって、生産性が向上する。

また、L-トリプトファンは、脱感作型アントラニル酸合成酵素をコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロン(特開昭57-71397号、特開昭62-244382号、米国特許第4,371,614)を増強することによって、生産性が向上する。

【0043】

上記のようにして得られるL-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0044】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-アミノ酸を安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.001~30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0045】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45℃に保持して行われ、通常24~120時間で終了する。

培養物からのL-リジンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0046】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0047】

【実施例1】 L-リジン生産菌の創製(1)

<1>メチロフィラス属細菌への変異型lysC及び変異型dapAの導入

変異型lysC及び変異型dapAは、これらを含む公知のプラスミドRSFD80 (W095/16042号参照) を用いてメチロフィラス属細菌に導入した。RSFD80は、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsyganov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター (tetP) の下流に、tetPに対して転写方向が正方向となるようにE. coli由来の変異型dapA及び変異型lysCがこの順序で配置されている。この変異型dapAは、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコードしている。また、前記変異型lysCは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコードしている。

【0048】

RSFD80は、以下に示すようにして構築された。プラスミドpdapAS24上にある変異型dapAをpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図1に示す様にしてRSF24Pを得た。次に、このRSF24Pと、変異型lysCを含むpLLC*80から、変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80を図2の様に作製した。すなわち、pVIC40はスレオニンオペロンを含んでいるが、RSFD80ではこのスレオニンオペロンが変異型dapAを含むDNA断片及び変異型lysCを含むDNA断片と置換されている。

【0049】

RSFD80プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は、1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。

【0050】

E. coli AJ1239株を、ストレプトマイシンを20mg/L含む30mlのLB培地で30℃で

12時間培養して得た菌体から、Wizard^R Plus Midipreps DNA Purification System (プロメガ社より市販)を用いてRSFD80プラスミドを精製した。

【0051】

上記のようにして得られたRSFD80プラスミドを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)) によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入した。なお、対照として、RSFD80プラスミドを作製する際に用いたpVIC40プラスミドよりスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つpRSプラスミド (特表平3-501682号公報参照) を、RSFD80と同様にしてAS1株に導入した。

【0052】

<2>E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌のAKIII活性

RSFD80プラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/RSFD80」と略すことがある) と、pRSプラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/pRS」と略すことがある) より、無細胞抽出液を調製し、AK活性を測定した。無細胞抽出液 (粗酵素液) は次のようにして調製した。AS1/RSFD80およびAS1/pRS株を、ストレプトマイシン20mg/Lを含む下記組成の121培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養し、集菌した。培地のpHは水酸化ナトリウム水溶液または塩酸で調整した。培地は各成分を溶解した後120℃15分間の蒸気滅菌を行った。メタノールは、メンブレンフィルター (ミリポア社製、0.45 μ m) で除菌した後、蒸気滅菌した培地に添加した。

【0053】

(121培地の組成)

| | |
|------------|--------|
| メタノール | 2% |
| リン酸二カリウム | 0.12% |
| リン酸一カリウム | 0.062% |
| 塩化カルシウム六水塩 | 0.005% |
| 硫酸マグネシウム | 0.02% |
| 塩化ナトリウム | 0.01% |

| | |
|-----------------|--------------|
| 塩化第三鉄 | 1.0mg/L |
| 硫酸アンモニウム | 0.3% |
| 硫酸銅 5 水塩 | 5 μ g/L |
| 硫酸マンガン 5 水塩 | 10 μ g/L |
| モリブデンナトリウム 2 水塩 | 10 μ g/L |
| ホウ酸 | 10 μ /L |
| 硫酸亜鉛 | 70 μ g/L |
| 塩化コバルト | 5 μ g/L、 |

(pH7.0)

【0054】

上記のようにして得られた菌体を、0℃の条件下で0.2% KClで洗浄し、10mM MgSO_4 , 0.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7) に懸濁し、超音波処理 (0℃、200W、10分) で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下で、3,300rpmで30分間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、0℃で1時間放置した後遠心し、ペレットを10mM MgSO_4 , 0.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7) に溶解した。

【0055】

AK活性の測定はスタットマンらの方法 (Stadtman, E. R., Cohen, G. N., Le Bras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961)) に従った。すなわち、下記組成の反応液を30℃で45分インキュベートし、 FeCl_3 溶液 (2.8N HCl: 0.4ml, 12%TCA: 0.4ml, 5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /0.1N HCl: 0.7ml) を加えて発色させ、これを遠心後、上清の540nmでの吸光度を測定した。活性は1分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示 (1U=1 μ mol/分) した。モル吸光係数は600とした。なお、反応液からアスパラギン酸カリウムをのぞいたものをブランクとした。酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表1に示した。

【0056】

(反応液組成)

| | |
|--------------------------------|-------|
| reaction mixture ^{*1} | 0.3ml |
| ヒドロキシルアミン溶液 ^{*2} | 0.2ml |
| 0.1Mアスパラギン酸カリウム(pH7.0) | 0.2ml |
| 酵素液 | 0.1ml |
| 水 (バランス) | 計 1ml |

*1: 1M Tris-HCl(pH8.1) 9ml, 0.3M MgSO₄ 0.5ml, 0.2M ATP(pH7.0) 5ml

*2: 8Mヒドロキシルアミン溶液を直前にKOHで中和したもの

【0057】

【表1】

表1

| 菌株 | AK活性 (比活性 ^{*1}) | L-リジン5mM存在 時の比活性 | 阻害解除度 ^{*2} (%) |
|------------|------------------------------|---------------------|----------------------------|
| AS1/pRS | 7.93 | 9.07 | 114 |
| AS1/RSFD80 | 13.36 | 15.33 | 115 |

*1: nmol/分/mgタンパク質

*2: L-リジン5mM存在時の活性保持率

【0058】

表1に示すように、RSFD80プラスミドの導入によりAK活性が約1.7倍に上昇した。また、RSFD80プラスミドにコードされるE. coli由来のAKはL-リジンにより阻害が完全に解除されていることが確認された。また、AS1株が元来保持するAKは、L-リジン単独では阻害を受けないことがわかった。尚、本発明者らは、AS1株由来のAKは、L-リジンとL-スレオニンが反応液中に各2mMずつ存在するときに、100%阻害されることを発見している（協奏阻害）。

【0059】

<3>E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

次に、AS1/RSFD80およびAS1/pRS株をストレプトマイシン20mg/Lおよび30g/Lの炭酸カルシウム（関東化学製）を含む121培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表2に示す。

【0060】

【表2】

表2

| 菌株 | L-リジン塩酸塩の生産量 (g/L) |
|------------|-----------------------|
| AS1/pRS | 0 |
| AS1/RSFD80 | 0.3 |

【0061】

【実施例2】L-リジン生産菌の創製（2）

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）を121培地で37℃、15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理（NTG濃度100mg/L、37℃、5分）し、S-（2-アミノエチル）-システイン（AEC）7g/L、及びL-スレオニン3g/Lを含有する121寒天培地（寒天1.5%を含む121培地）に塗布した。これを、37℃で2～8日間培養し、生じたコロニーを釣菌分離して、AEC耐性株を取得した。

【0062】

上記のAEC耐性株を、30g/Lの炭酸カルシウム（関東化学製）を含む121培地に植菌し、好氣的に37℃で38時間培養した。培養終了後、培地から菌体、炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。親株よりL-リジン生産能が向上した株を選択し、メチロフィラス・メチロトロファスAR-166

株と命名した。親株（AS1株）及びAR-166株のL-リジン生産量を表3に示す。

【0063】

【表3】

表3

| 菌株 | L-リジン塩酸塩の生産量 (mg/L) |
|--------|------------------------|
| AS1 | 5.8 |
| AR-166 | 80 |

【0064】

メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株は、プライベートナンバーAJ13608が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17416として寄託されている。

【0065】

【実施例3】分岐鎖アミノ酸生産菌の創製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）を121培地で37℃、15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理（NTG濃度100mg/L、37℃、5分）し、カザミノ酸（DIFCO社製）0.5%を含有する121寒天培地に塗布した。これを37℃で2～8日間培養し、コロニーを形成させた。これらのコロニーを釣菌分離して、121寒天培地及びカザミノ酸0.5%を含有する121寒天培地に植菌し、前者に比べて後方で生育がよい株を選択し、これをカザミノ酸要求株とした。こうして、500株のNTG処理株から9株のリーキーなカザミノ酸要求株を得た。これらのカザミノ酸要求株から、L-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンを親株よりも多く培地中に蓄積する株を1株得た。これをメチロフィラス・メチロトロファスC138株と命名した。

メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株は、プライベートナンバーAJ1360

9が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号 FERM P-17417として寄託されている。

【0066】

親株（AS1株）及びC138株を、30g/Lの炭酸カルシウム（関東化学製）を含む121培地に植菌し、好氣的に37℃で34時間培養した。培養終了後、培地から菌体、炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンの濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表4に示す。

【0067】

【表4】

表4

| 菌株 | L-バリン (mg/L) | L-ロイシン (mg/L) | L-イソロイシン (mg/L) |
|------|-----------------|------------------|--------------------|
| AS1 | 7.5 | 5.0 | 2.7 |
| C138 | 330 | 166 | 249 |

【0068】

【発明の効果】

本発明により、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌及び同細菌を用いたL-アミノ酸の製造法が提供される。本発明の方法によれば、メタノールを原料としてL-アミノ酸を製造することが可能となる。

【0069】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

<130> P-6500

<141> 1999-06-16

<150> JP 11-103143

<151> 1999-04-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0070】

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1147)

<400> 1

```
ccaggcgact gtttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
caattccacg gcgatcgga cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
tgtcaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaca 180
tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgttttta atgccatacc aaacgtacca 240
ttgagacact tgtttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292
```

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 5 |
| gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc | | | | | | | | | | | | | | | | 340 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | 15 | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc | | | | | | | | | | | | | | | | 388 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | 30 | | | | | 35 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa | | | | | | | | | | | | | | | | 436 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | | | 45 | | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att | | | | | | | | | | | | | | | | 484 | | | | | | | | | | | | | | | |
| His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc | | | | | | | | | | | | | | | | 532 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 75 | | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta | | | | | | | | | | | | | | | | 580 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 90 | | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc | | | | | | | | | | | | | | | | 628 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 105 | | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg | | | | | | | | | | | | | | | | 676 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 120 | | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg | | | | | | | | | | | | | | | | 724 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta | | | | | | | | | | | | | | | | 772 | | | | | | | | | | | | | | | |

Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu
155 160 165
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg 820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu
170 175 180
ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt 868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly
185 190 195
cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc 916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala
200 205 210 215
cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt 964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val
220 225 230
att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc 1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro
235 240 245
aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg 1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala
250 255 260
acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt 1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg
265 270 275
gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taaagtttag 1157
Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu
280 285 290
ggagatttga tggcttactc tgttcaaaag tcgcgcctgg 1197

【 0 0 7 1 】

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys

1 5 10 15

Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val

20 25 30

Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser

35 40 45

Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu

50 55 60

Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn

65 70 75 80

Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly

85 90 95

Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

100 105 110

Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu

115 120 125

Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu

130 135 140

Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile

145 150 155 160

Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu

165 170 175

Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu

180 185 190

Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn
 195 200 205
 Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu
 210 215 220
 His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His
 225 230 235 240
 Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys
 245 250 255
 Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr
 260 265 270
 Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His
 275 280 285
 Ala Gly Leu Leu
 290

【 0 0 7 2 】

<210> 3

<211> 2147

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (584)..(1930)

<400> 3

tcgaagtgtt tctgtagtgc ctgccaggca gcggtctgcg ttggattgat gtttttcatt 60
 agcaatactc ttctgatttt gagaattgtg actttggaag attgtagcgc cagtcacaga 120
 aaaatgtgat ggttttagtg ccgttagcgt aatgttgagt gttaaaccctt agcgcagtga 180
 agcatttatt agctgaacta ctgaccgcca ggagtggatg aaaaatccgc atgaccccat 240

cgttgacaac cgccccgctc accctttatt tataaatgta ctacctgcgc tagcgcaggc 300
 cagaagaggc gcgttgccca agtaacgggtg ttggaggagc cagtcctgtg ataacacctg 360
 aggggggtgca tcgccgaggt gattgaacgg ctggccacgt tcatcatcgg ctaagggggc 420
 tgaatcccct gggttgtcac cagaagcgtt cgagtcggg cgtttcgcaa gtggtggagc 480
 acttctgggt gaaaatagta gcgaagtatc gctctgcgcc caccgtctt ccgctcttcc 540
 cttgtgccaa ggctgaaaat ggatcccctg acacgaggta gtt atg tct gaa att 595

Met Ser Glu Ile

1

gtt gtc tcc aaa ttt ggc ggt acc agc gta gct gat ttt gac gcc atg 643
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met
 5 10 15 20
 aac cgc agc gct gat att gtg ctt tct gat gcc aac gtg cgt tta gtt 691
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val

25 30 35
 gtc ctc tcg gct tct gct ggt atc act aat ctg ctg gtc gct tta gct 739
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala
 40 45 50

gaa gga ctg gaa cct ggc gag cga ttc gaa aaa ctc gac gct atc cgc 787
 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg
 55 60 65
 aac atc cag ttt gcc att ctg gaa cgt ctg cgt tac ccg aac gtt atc 835
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile

70 75 80
 cgt gaa gag att gaa cgt ctg ctg gag aac att act gtt ctg gca gaa 883
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu
 85 90 95 100
 gcg gcg gcg ctg gca acg tct ccg gcg ctg aca gat gag ctg gtc agc 931
 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser

105

110

115

| | |
|---|------|
| cac ggc gag ctg atg tgc acc ctg ctg ttt gtt gag atc ctg cgc gaa | 979 |
| His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu | |
| 120 125 130 | |
| cgc gat gtt cag gca cag tgg ttt gat gta cgt aaa gtg atg cgt acc | 1027 |
| Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr | |
| 135 140 145 | |
| aac gac cga ttt ggt cgt gca gag cca gat ata gcc gcg ctg gcg gaa | 1075 |
| Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu | |
| 150 155 160 | |
| ctg gcc gcg ctg cag ctg ctc cca cgt ctc aat gaa ggc tta gtg atc | 1123 |
| Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile | |
| 165 170 175 180 | |
| acc cag gga ttt atc ggt agc gaa aat aaa ggt cgt aca acg acg ctt | 1171 |
| Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu | |
| 185 190 195 | |
| ggc cgt gga ggc agc gat tat acg gca gcc ttg ctg gcg gag gct tta | 1219 |
| Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu | |
| 200 205 210 | |
| cac gca tct cgt gtt gat atc tgg acc gac gtc ccg ggc atc tac acc | 1267 |
| His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr | |
| 215 220 225 | |
| acc gat cca cgc gta gtt tcc gca gca aaa cgc att gat gaa atc gcg | 1315 |
| Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala | |
| 230 235 240 | |
| ttt gcc gaa gcg gca gag atg gca act ttt ggt gca aaa gta ctg cat | 1363 |
| Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His | |
| 245 250 255 260 | |
| ccg gca acg ttg cta ccc gca gta cgc agc gat atc ccg gtc ttt gtc | 1411 |
| Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val | |

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 265 | 270 | 275 | |
| ggc tcc agc aaa gac cca cgc gca ggt ggt acg ctg gtg tgc aat aaa | | | 1459 |
| Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys | | | |
| 280 | 285 | 290 | |
| act gaa aat ccg ccg ctg ttc cgc gct ctg gcg ctt cgt cgc aat cag | | | 1507 |
| Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln | | | |
| 295 | 300 | 305 | |
| act ctg ctc act ttg cac agc ctg aat atg ctg cat tct cgc ggt ttc | | | 1555 |
| Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe | | | |
| 310 | 315 | 320 | |
| ctc gcg gaa gtt ttc ggc atc ctc gcg cgg cat aat att tcg gta gac | | | 1603 |
| Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp | | | |
| 325 | 330 | 335 | 340 |
| tta atc acc acg tca gaa gtg agc gtg gca tta acc ctt gat acc acc | | | 1651 |
| Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr | | | |
| 345 | 350 | 355 | |
| ggt tca acc tcc act ggc gat acg ttg ctg acg caa tct ctg ctg atg | | | 1699 |
| Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met | | | |
| 360 | 365 | 370 | |
| gag ctt tcc gca ctg tgt cgg gtg gag gtg gaa gaa ggt ctg gcg ctg | | | 1747 |
| Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu | | | |
| 375 | 380 | 385 | |
| gtc gcg ttg att ggc aat gac ctg tca aaa gcc tgc ggc gtt ggc aaa | | | 1795 |
| Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys | | | |
| 390 | 395 | 400 | |
| gag gta ttc ggc gta ctg gaa ccg ttc aac att cgc atg att tgt tat | | | 1843 |
| Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr | | | |
| 405 | 410 | 415 | 420 |
| ggc gca tcc agc cat aac ctg tgc ttc ctg gtg ccc ggc gaa gat gcc | | | 1891 |

Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala

425

430

435

gag cag gtg gtg caa aaa ctg cat agt aat ttg ttt gag taaatactgt 1940

Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu

440

445

atggcctgga agctatattt cgggccgtat tgattttctt gtcactatgc tcatcaataa 2000

acgagcctgt actctgttaa ccagcgtctt tatcggagaa taattgcctt taattttttt 2060

atctgcatct ctaattaatt atcgaaagag ataaatagtt aagagaaggc aaaatgaata 2120

ttaacagttc tgctcgcaaa ggaattc 2147

【0 0 7 3】

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp

1

5

10

15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn

20

25

30

Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu

35

40

45

Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu

50

55

60

Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr

65

70

75

80

Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr

85

90

95

Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | |
| Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn | | | |
| 325 | 330 | 335 | |

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

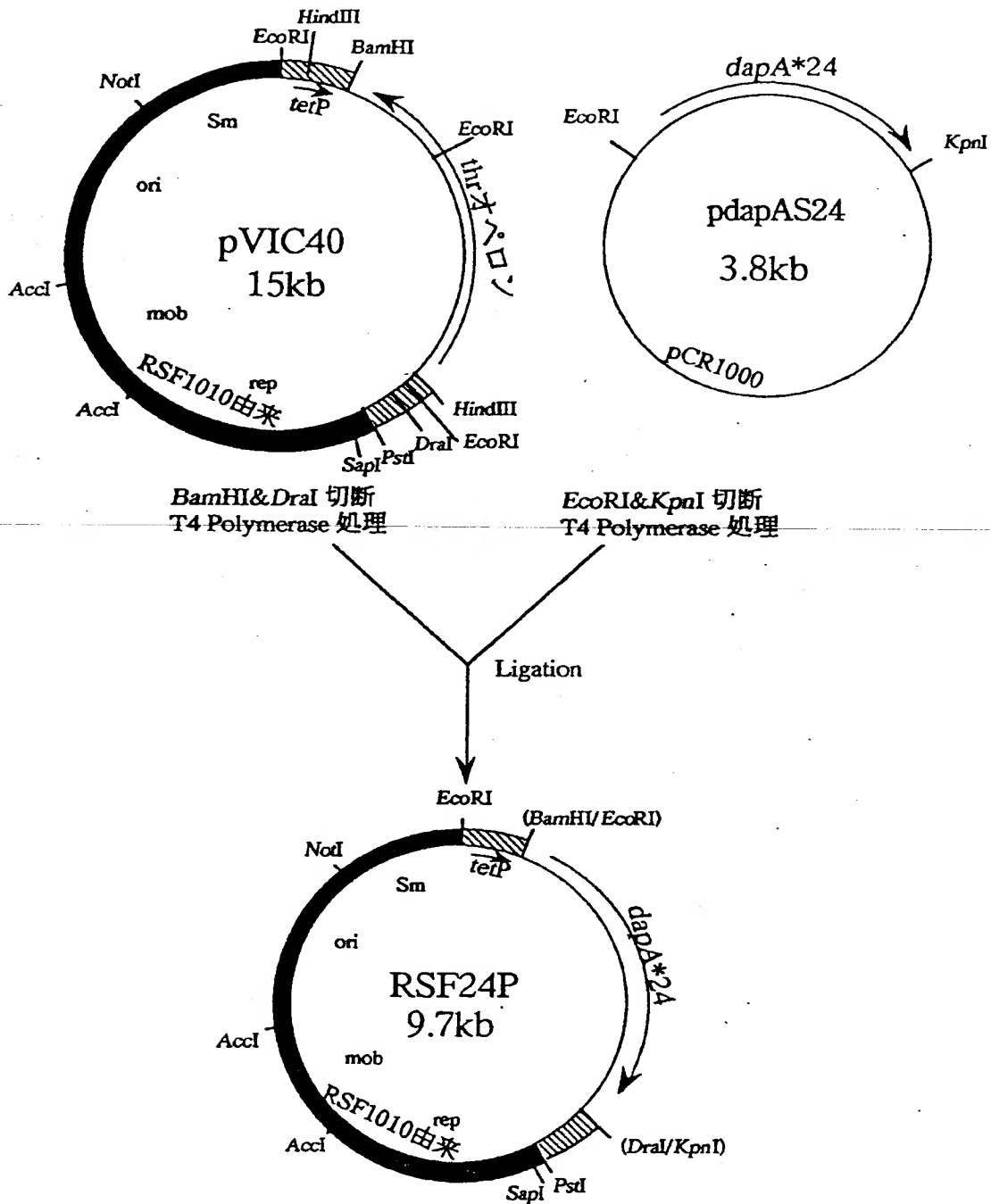
【図面の簡単な説明】

【図 1】 変異型dapAを有するプラスミドRSF24Pの製造工程を示す図。「dapA^{*24}」は、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコード変異型dapAを表す。

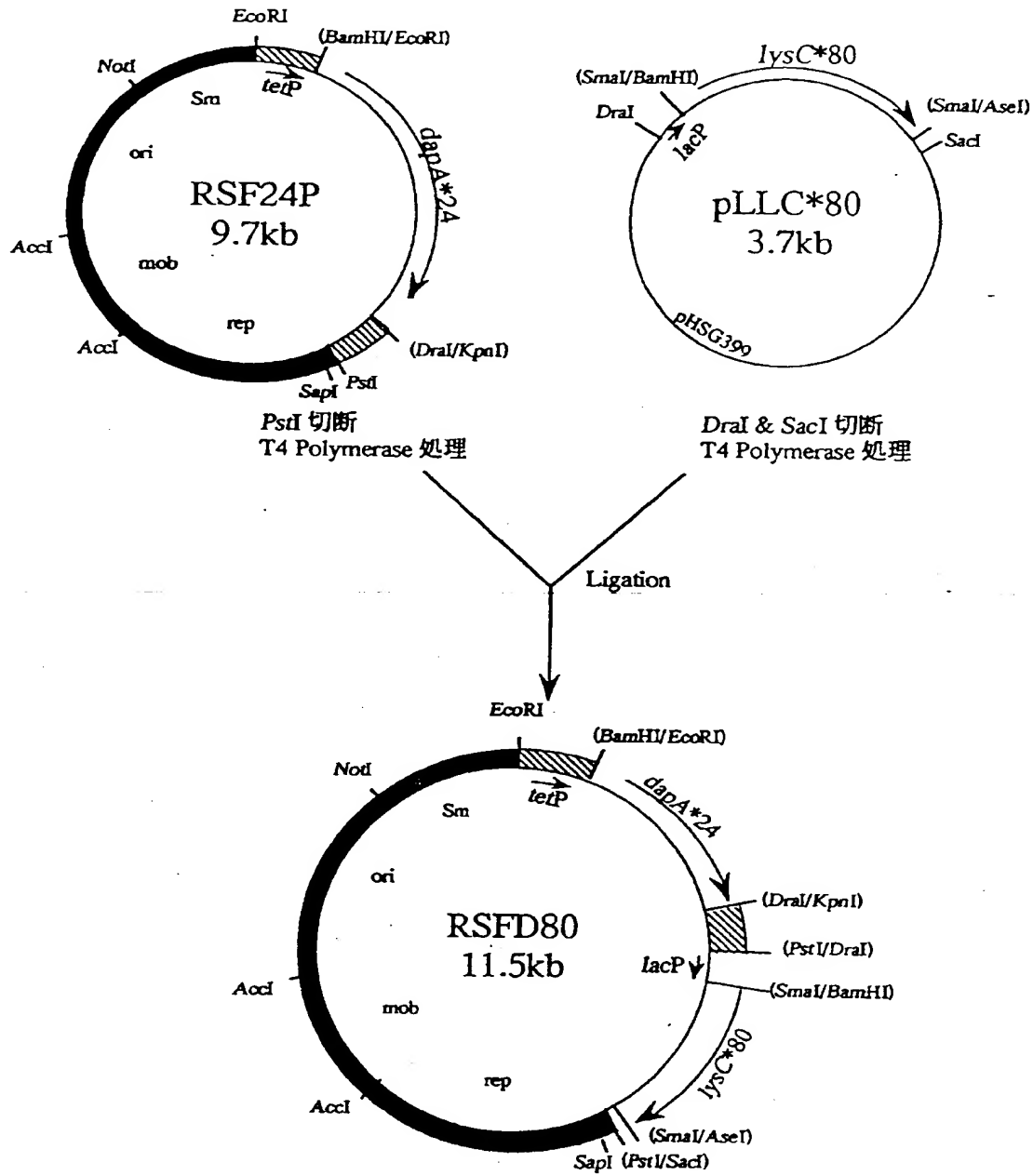
【図 2】 変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80の製造工程を示す図。「lysC^{*80}」は、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコード変異型lysCを表す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノールを主炭素源として発酵法によりL-アミノ酸を効率よく生産する微生物、及び同微生物を用いてL-アミノ酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 メタノールを主たる炭素源として生育することができ、かつ、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えば、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強されたメチロフィラス属細菌、又はカザミノ酸要求性となったメチロフィラス属細菌を、メタノールを主たる炭素源とする培地に培養し、該培養物中にL-リジン等のアミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造する。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社